

Е. А. Полтева, Н. В. Дементьева, Ю. С. Щербаков, Л. В. Козикова, А. П. Дысин, Н. Р. Рейнбах

Идентификация межпородных химер кур и перспективы их использования

Аннотация.

Химерные птицы представляют интерес в селекции и генетической инженерии. Идентификация таких птиц изначально была фенотипической, для чего использовались породы с контрастным цветом оперения. Но этот метод несовершенен, и **целью** данной работы являлась разработка оптимального метода идентификации межпородных химер птиц.

Материалы и методы. На базе ЦКБ БК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур ВНИИГРЖ» были выбраны 4 породы: полтавская глинистая, суссекс, брама палевая и брама светлая в качестве доноров и реципиентов. Эти породы были подобраны, исходя из генетических различий: брама палевая и полтавская глинистая имеют аллель *s+* гена *Silver*, брама светлая и суссекс имеют аллель *S* того же гена. При этом отличие между двумя аллелями обеспечивается однонуклеотидной заменой C\T, что заметно упрощает идентификацию. Химеры были получены методом трансплантации донорских клеток в эмбрионы-реципиенты. Среди полученных птиц некоторые демонстрировали мозаичный фенотип с проявлением признаков донорской породы, другие же имели фенотип реципиентной породы. После забоя птиц были взяты образцы тканей из яичников, семенников и печени. Из них выделяли ДНК стандартным фенольно-детергентным способом. Образцы ДНК исследовали методом амплификации с помощью аллелеспецифичных зондов по локусу гена *SLC45A2* (*Silver*), расположенному на Z-хромосоме (аллели *S* и *s+*).

Результаты генотипирования показали, что среди проанализированных образцов ДНК из 12 экспериментальных птиц у 5 обнаружено наличие донорского и реципиентного генотипов. При этом у 4 химер донорский генотип обнаружен в органах размножения, т.е. данные химеры являются половыми и могли бы передать донорский генотип потомкам.

Ключевые слова: химеры, бластодермальные клетки, породы кур, амплификация, аллелеспецифичные зонды.

Авторы:

Полтева Е. А. — младший научный сотрудник; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru;

Дементьева Н. В. — кандидат биологических наук; e-mail: dementevan@mail.ru;

Щербаков Ю. С. — кандидат биологических наук; e-mail: yura.10.08.94.94@mail.ru;

Козикова Л. В. — доктор биологических наук; e-mail: larkozik@list.ru;

Дысин А. П. — младший научный сотрудник;

Рейнбах Н. Р. — младший научный сотрудник.

Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных – филиал ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр животноводства – ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста»; 196625, Россия, г. Санкт-Петербург, пос. Тярлево, Московское шоссе, д. 55а.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (тема 0445-2021-0010).

Введение. Первые попытки получения химер птиц были предприняты Marzullo в 1970 г. [1] с применением метода инъекции клеток. В качестве донорских эмбрионов были использованы клетки пород кур Rhode Island Red (Род-Айленд Красный). Реципиентами служили эмбрионы кур породы белый леггорн. На 15-й день инкубации выжили около 8 % эмбрионов, среди которых только у одного процента был выявлен генетический химеризм по наличию меланоцитов, принадлежащих донору.

Спустя 20 лет были получены первые соматические и половые химеры птиц [2], тестированные методом DNA fingerprinting. Эти эксперименты продемонстрировали, что трансплантированные бластодермальные клетки могут интегрироваться в чужеродный геном и дифференцироваться в разные типы клеток, в том числе и в половые. В дальнейшем межпородные химеры были получены в нескольких лабораториях [3, 4] при использовании как нативных, так и замороженно-оттаянных донорских клеток

[5, 6]. В процессе криоконсервации способность бластодермы к замораживанию и оттаиванию клеток дает возможность восстановить популяции птиц, находящиеся под угрозой исчезновения [7].

Важную роль химеры птиц могут сыграть при изучении определения пола, т.к. химерные организмы несут в себе клетки женского типа (ZW) и мужского (ZZ). Для проверки того, как дифференцируются половые клетки в химерных птицах, исследователи разделили донорские клетки по полу методом *in situ* гибридизации с использованием ДНК-зонда, специфичного для W-хромосомы, после чего имплантировали их в эмбрионы, находящиеся на той же стадии развития [8]. В случае переноса женских (ZW) бластодермальных клеток в мужские (ZZ) эмбрионы-реципиенты полученные химеры имели мужской пол, тогда как при переносе мужских бластодермальных клеток в женские эмбрионы получались химеры обоих полов примерно в равных пропорциях. Дальнейшие исследования мужских химер с ZW-клетками показало, что сперматозоиды с W-хромосомой являются не функциональными, а сперматозоиды с Z-хромосомой способны к оплодотворению. Так было показано, что женская половая клетка может дифференцироваться в функциональные гаметы в мужских половых железах. Работы других авторов [9] подтвердили необычные свойства женских половых клеток, хотя молекулярные механизмы этого феномена пока не известны. Также после инъекции мужских бластодермальных клеток самкам-реципиентам были получены как мужские, так и женские химеры почти в равной пропорции. Мужские зародышевые клетки (ZZ) оказались способны дифференцироваться в функциональные гаметы в яичниках, и от них было получено потомство. Тем не менее ряд исследователей утверждает, что не все мужские первично-половые клетки из крови могут дифференцироваться в функциональные гаметы в женских яичниках [10].

Следует подчеркнуть, что кроме межпородных химер птиц [11] были получены и межвидовые химеры, например, между японской перепелкой и пекинской уткой [12]. Эти химеры также были созданы методом инъекции бласто-



Рис. 1. Оперение химерной птицы. Реципиент породы брама палевая, донорские клетки породы брама светлая. Видны характерные для фенотипа донора белые перья.

дермальных клеток, но эффективность производства потомства была очень низкой.

Дальнейшие исследования необходимы для повышения эффективности получения потомства донорских клеток. Многие исследователи определяют химер разных пород птиц по фенотипам. Однако следует учитывать, что не у всех химерных организмов выражен фенотип доноров. Мы также применяли этот показатель, используя кур с контрастным оперением [13, 14]. Примером может служить химера, у которой донорским материалом были клетки породы брамы светлой, а реципиентом служил эмбрион кур породы брама палевая (рис. 1).

Целью исследования являлась разработка метода идентификации межпородных химер птиц. Для этого были изучены генетические особенности различных пород птиц; выбраны породы, отличие между которыми легко идентифицировать; получены химерные птицы; подобраны праймеры и режимы амплификации для проведения реал-тайм ПЦР.

Таблица 1. Используемые праймеры и зонды

Название праймеров	Последовательность зондов
F_silver	CCCATGAAATCCGTGAAGAAGA
R_silver	GCCATCCCATTATCGCTGTCT
SIN3_Allele1	(FAM)ATGTTGGACAGGAAAGCCA(BHQ1)
SIN3_Allele2	(ROX)TGTTGGACATGAAAGCCA(BHQ2)

Материалы и методы. На базе ЦКБ БК «Генетическая коллекция редких и исчезающих пород кур ВНИИГРЖ» были выбраны породы для получения химер, основываясь на контрастности оперения: полтавская глинистая донор — суссекс реципиент; суссекс донор — полтавская глинистая реципиент; брама палевая реципиент — брама светлая донор; брама светлая донор — брама палевая реципиент. Эти породы были подобраны, основываясь на генетических различиях: порода кур брама палевая и порода полтавская глинистая имеют аллель *s*⁺ гена *Silver*, порода брама светлая и порода суссекс имеют аллель *S* того же гена. При этом отличие между двумя аллелями обеспечивается однонуклеотидной заменой C\T в SNP rs314509501, что заметно упрощает идентификацию.

Донорские бластодермальные клетки были отобраны из бластодисков и культивировались в питательной среде DMEM с добавлением фетальной сыворотки и антибиотиков в течение 2 суток, после чего имплантировались в эмбрионы-реципиенты и помещались в инкубаторы. Более подробно о методе получения химер птиц, выводимости и выживаемости эмбрионов, а также об особенностях фенотипа химер можно ознакомиться в статьях Л. В. Козиковой и Е.

А. Полтевой [13, 14].

Молекулярно-генетический анализ химер птиц. Материалом служила ДНК, которую выделяли из тканей яйчников, семенников и печени птиц. До использования образцы хранили при температуре -20°C . Геномную ДНК выделяли стандартным фенольно-детергентным способом. Концентрацию и степень чистоты образцов определяли с помощью прибора NanoDrop 2000.

Образцы тканей были исследованы методом амплификации с помощью аллелеспецифичных зондов по локусу *SLC45A2* (*Silver*), расположенному на Z-хромосоме (аллели *S* и *s*⁺). В программе BLAST были подобраны праймеры и зонды, представленные в таблице 1.

Амплификация производилась по следующему протоколу: 95°C 2 минуты предварительная денатурация; 40 циклов 95°C 15 секунд, отжиг 60°C 25 секунд со считыванием; после 40 циклов инкубация при 60°C 30 секунд с постсчитыванием.

Результаты и обсуждение. У взрослых межпородных химер кур были взяты образцы тканей (яйчник, семенник, печень) следующих пород: полтавская глинистая донор — суссекс реципиент; суссекс донор — полтавская глинистая реципиент; брама палевая реципиент — брама светлая донор; брама светлая реципиент — бра-

Таблица 2. Результаты генотипирования взрослых межпородных химер с использованием аллелеспецифичных зондов

Исследуемое животное	Генотип реципиента	Генотип донора	Органы	Результат анализа	Вывод
♀ Полтавская глинистая 1	<i>s</i> ⁺ / <i>-</i>	<i>S</i>	Яйчник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♀ Полтавская глинистая 2	<i>s</i> ⁺ / <i>-</i>	<i>S</i>	Яйчник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♀ Суссекс 1	<i>S</i> / <i>-</i>	<i>s</i> ⁺	Яйчник Печень	<i>S</i> , <i>s</i> ⁺ <i>S</i> , <i>s</i> ⁺	Химеризм подтвержден Половая химера
♂ Брама палевая	<i>s</i> ⁺ / <i>s</i> ⁺	<i>S</i>	Семенник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♂ Суссекс 2	<i>S</i> / <i>S</i>	<i>s</i> ⁺	Семенник Печень	<i>S</i> <i>S</i> , <i>s</i> ⁺	Химеризм подтвержден Соматическая химера
♂ Суссекс 3	<i>S</i> / <i>S</i>	<i>s</i> ⁺	Семенник Печень	<i>S</i> , <i>s</i> ⁺ <i>S</i> , <i>s</i> ⁺	Химеризм подтвержден Половая химера
♂ Суссекс 4	<i>S</i> / <i>S</i>	<i>s</i> ⁺	Семенник Печень	<i>S</i> , <i>s</i> ⁺ <i>S</i> , <i>s</i> ⁺	Химеризм подтвержден Половая химера
♂ Брама светлая	<i>S</i> / <i>S</i>	<i>s</i> ⁺	Семенник Печень	<i>S</i> , <i>s</i> ⁺ <i>S</i> , <i>s</i> ⁺	Химеризм подтвержден Половая химера
♂ Полтавская глинистая 3	<i>s</i> ⁺ / <i>s</i> ⁺	<i>S</i>	Семенник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♂ Полтавская глинистая 4	<i>s</i> ⁺ / <i>s</i> ⁺	<i>S</i>	Семенник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♂ Полтавская глинистая 5	<i>s</i> ⁺ / <i>s</i> ⁺	<i>S</i>	Семенник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден
♂ Полтавская глинистая 6	<i>s</i> ⁺ / <i>s</i> ⁺	<i>S</i>	Семенник Печень	<i>s</i> ⁺ <i>s</i> ⁺	Химеризм не подтвержден

ма палевая донор. Эти породы были подобраны, основываясь на генетических различиях: порода брама палевая и порода полтавская глинистая имеют аллель s+ гена Silver, порода брама светлая и порода суссекс имеют аллель S того же гена. При этом отличие между двумя аллелями обеспечивается однонуклеотидной заменой C\T, что заметно упрощает идентификацию. Анализ выделенной из образцов ДНК проходил с использованием аллелеспецифичных зондов (табл. 2).

Таким образом, из представленных результатов можно сделать вывод, что среди проанализированных образцов ДНК 12 экспериментальных птиц у 5 обнаружено наличие не только реципиентного, но и донорского генотипа, т.е. химеризма. При этом у четырёх химер донорский генотип обнаружен в органах размножения, что свидетельствует, что данные химеры являются половыми и могли бы передать донорский генотип потомкам.

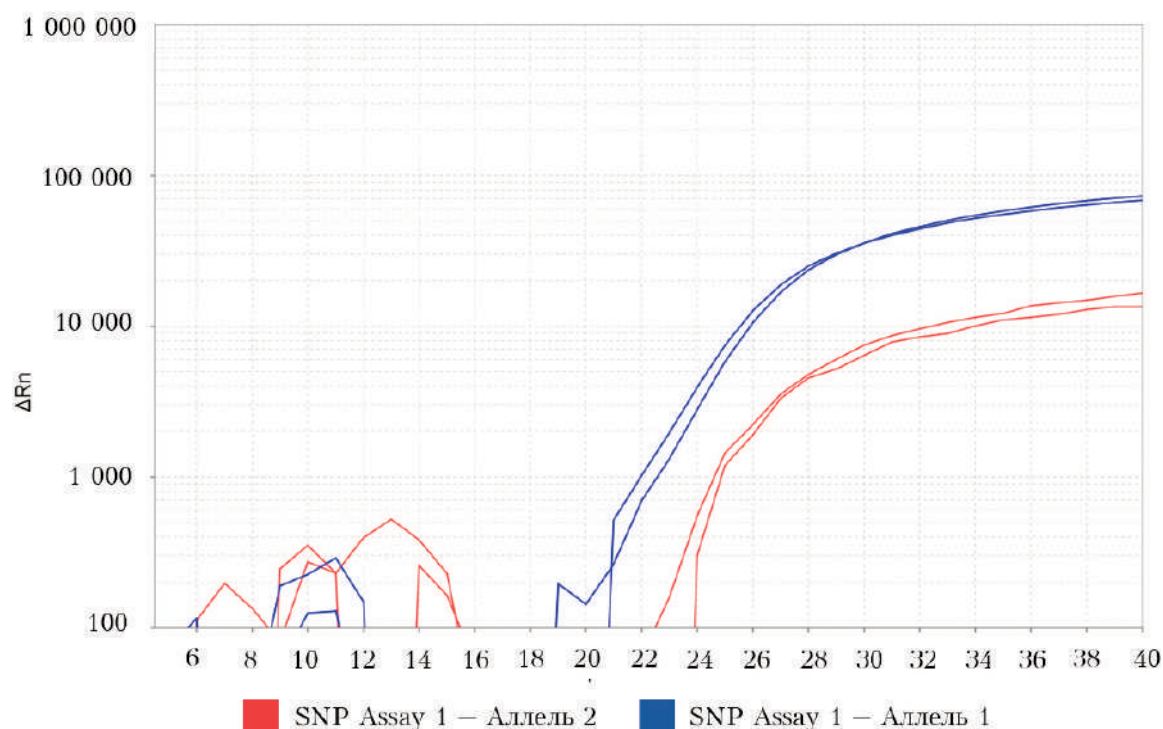


Рис. 2. Результат генотипирования образцов птицы ♀ Суссекс 1. Синим показано содержание в яйчнике и печени аллеля S, красным показано содержание аллеля s+.

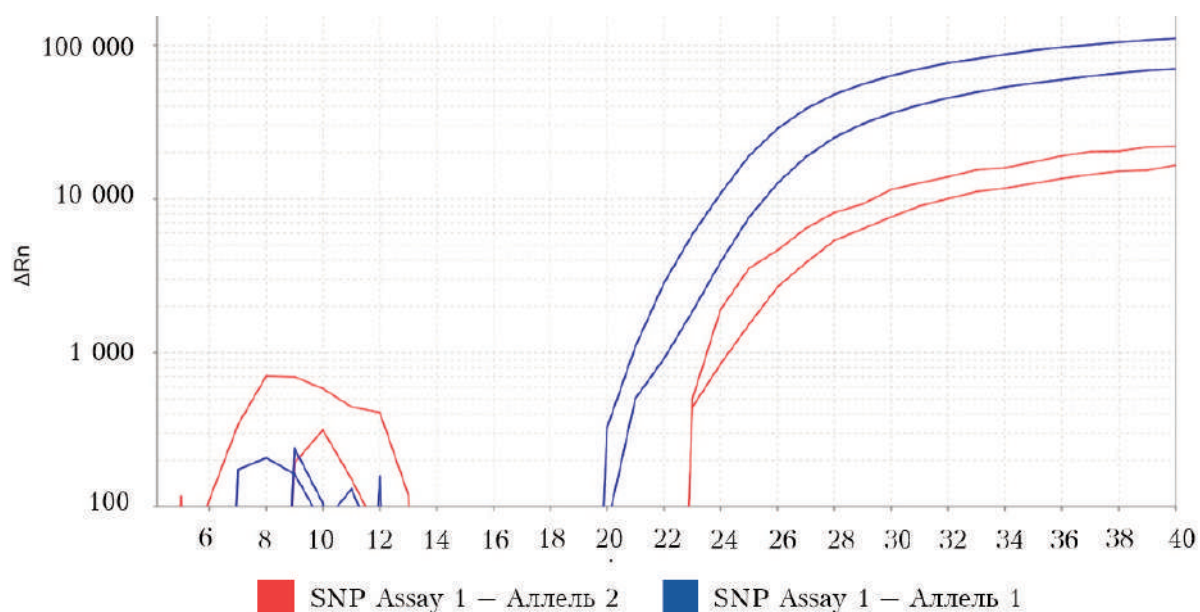


Рис. 3. Результат генотипирования образцов птицы ♂ Брама светлая. Синим показано содержание в семеннике и печени аллеля S, красным показано содержание аллеля s+.

В наших экспериментах мы не определяли пол доноров и реципиентов, поэтому получали смешанных по полу цыплят химер. Как показали исследования других авторов частота химеризма и скорость передачи зародышевой линии от донора в смешанных половых химерах были очень близки к таковым в однополых химерах, что предполагает, что первично-половые клетки на стадии Х имеют такую же способность дифференцироваться в нормальные гаметы в гонадах противоположного пола, как в гонадах того же пола [4]. Эти результаты указывают на возможность изменить соотношение полов у домашней птицы путем переноса культивируемых первично-половых клеток в геном реципиентов, т.к. эти клетки могут дифференцироваться в функциональные гаметы.

Важную роль в настоящее время играет оценка генома с учетом SNP-маркеров. Генотипирование необходимо для определения наличия определенных нуклеотидных последовательностей, что и определило наш выбор применения генотипирования с использованием аллелеспецифичных зондов для выявления донорских клеток в химерном организме. Как правило, авторы для идентификации химер применяли такие методы анализа ДНК как ПДРФ и ПЦР-амплификация полиморфных микросателлитных локусов [15]. Мы разработали новый методический подход анализа организмов, в состав которых входят клетки разных генотипов. Ранее нами использовался фенотипический анализ химер, для чего подбирались породы с контрастным фенотипом. Новый метод позволяет идентифицировать химер, у которых отсутствуют фенотипические проявления донорского генотипа, а также позволяет уточнить конкретную локализацию донорских клеток в организме химеры.

Перспективы применения химер огромны. Прежде всего химеры необходимы при разработке, применении методов редактирования геномов и получении трансгенных химерных животных, когда модифицированы ранние эмбриональные или первично половые клетки и трансплантированы в эмбрионы [16, 17] Следует отметить, что часто для редактирования генома необходимо соз-

давать промежуточные организмы — химеры, состоящие из клеток генетически различающихся птиц. Трансгенные химерные птицы могут быть хорошими производителями рекомбинантных белков. Японские исследователи получили генетически модифицированных цыплят, у которых экспрессия гена эритропоэтина была выявлена не только в сыворотке крови и яичном белке, но и в яичном желтке [18]. В Рослинском исследовательском центре вывели новый вид кур с измененным генотипом [19]. В белках яиц этих птиц содержатся протеины-антитела *mir24*, убивающие клетки меланомы, разновидности рака кожи. Эти результаты показывают, что возможна эффективная стратегия для получения фармацевтических гликопротеинов с использованием трансгенных куриных биореакторов. Создается новое медико-биологическое направление, позволяющее получать разные рекомбинантные белки, доступные для практического использования, причем химеры птиц служат промежуточным звеном. Генетически измененных химерных птиц можно использовать как модельные системы при изучении патогенеза многих заболеваний и создания уникальных белков. Химер можно использовать также и для сохранения редких и исчезающих пород и видов либо для восстановления исчезнувших, используя клетки из клеточных банков [20]. Сохранение генетических ресурсов также возможно при криоконсервации бластодермальных клеток как исходных форм, так и самих химер.

Заключение. Как показали результаты исследования, аллелеспецифичные зонды для локуса *SLC45A2* (Silver) могут быть использованы для идентификации межпородных химер, отличающихся по аллелям данного локуса. Данный метод исследования также одинаково хорошо работает на образцах ДНК, полученных из различных органов (печень, яичник, семенник).

В перспективе подобные зонды можно применять и в редактировании генома для идентификации трансформированных птиц либо для идентификации химерных птиц, которые используются для восстановления популяции на основе замороженно-оттаянных клеток.

Литература

1. Marzullo G. Production of chick chimeras / G. Marzullo // *Nature*. — 1970. — № 225. — P. 72–73.
2. Petite J. N. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells / J. N. Petite, M. E. Clark et al. // *Development*. — 1990. — № 108. — P. 185–189. doi: 10.1242/dev.108.1.185.
3. Thoraval P. Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells / P. Thoraval, F. Lasserre, F. Coudert, G. Dambrine // *Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells*. — 1994. — № 73(12). — P. 1897–1905. doi: 10.3382/ps.0731897.

4. Naito M. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chicken and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads / M. Naito, A. Sano et al // Reproduction. — 2001. — № 121. — P. 547–552. doi: 10.1530/rep.0.1210547.
5. Etches R. J. Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture / R. J. Etches, M. E. Clark, A. Toner, G. Liu, A. M. Gibbins // Molecular Reproduction and Development. — 1996. — № 45(3). — P. 291–298. doi: 10.1002/(SICI)1098-2795(199611)45:3<291::AID-MRD5>3.0.CO;2-N.
6. Kino K. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells / K. Kino, B. Pain, S. P. Leibo, M. Cochran, M. E. Clark, R. J. Etches // Poultry Science. — 1997. — № 76(5). — P. 753–760. doi: 0.1093/ps/76.5.753.
7. Etches R. J. Manipulation of blastodermal cells / R. J. Etches, M. E. Clark, L. Zajchowski, G. Speksnijder, A. M. Verringer Gibbins, K. Kino, B. Pain, J. Samaurt // Poultry Science. — 1997. — № 76. — P. 1075–1083. doi: 10.1093/ps/76.8.1075.
8. Kagami H. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline / H. Kagami, M. E. Clark, A. M. Verrinder Gibbins, R. J. Etches // Molecular Reproduction and Development. — 1995. — № 42(4). — P. 379–387. doi: 10.1002/mrd.1080420403.
9. Naito M. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood / M. Naito, Y. Matsubara et al // Journal of Reproduction and Fertility. — 1999. — № 117. — P. 291–298. doi: 10.1530/jrf.0.1170291.
10. Tajima A. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*) / A. Tajima, M. Naito, Y. Yasuda, T. Kuawana // Theriogenology. — 1993. — № 40. — P. 509–519. doi: 10.1016/0093-691x(93)90404-s.
11. Speksnijder G. A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilised chicken eggs / G. Speksnijder, R. Ivarie // Poult. Sci.. — 2000. — № 79. — P. 1430–1433. doi: 10.1093/ps/79.10.1430.
12. Gao J. Contribution of blastoderm cells to Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)-Peking duck (*Anas platyrhynchos*) chimeras / J. Gao, F. Yuan, X. Tang, H. Han, J. Sha, J. Yuan, Y. Shao, X. Jin, H. Liu, L. Rui, Z. Li // Anim. Sci. J. — 2011. — № 82. — P. 729–734. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00905.x.
13. Козикова Л. В. Создание фенотипических химер кур с использованием бластодермальных клеток пород брама светлая и брама палевая / Л. В. Козикова, Е. А. Полтева // Птицеводство. — 2021. — № 6. — С. 7–11. doi: 0/33845/0033-3239-2021-70-6-7-11.
14. Козикова Л. В. Химеры птиц, полученные методом трансплантации бластодермальных клеток пород суссекс светлый и полтавская глинистая / Л. В. Козикова, Е. А. Полтева // Птица и птицепродукты. — 2021. — № 3. — С. 21-23. doi: 10/30975/2073-4999-2021-23-3-21-23.
15. Bednarczyk M. Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds / M. Bednarczyk, P. Lakota et al. // Poultry Sci. — 2002. — № 81(9). — P. 1347-1353. doi: 10.1093/ps/81.9.1347.
16. Han J. Y. PGC and genomic editing from laboratory to practice / J. Y. Han; — Paris: Worlds Poultry Congress, 2022. — 69 p.
17. Зиновьева Н. А. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы / Н. А. Зиновьева, Н. А. Волкова, В. А. Багиров, Г. Брем // Экологическая генетика. — 2016. — № 6. — С. 657–668. doi: 10.1134/S2079059716060101.
18. Penno C. A. Production of recombinant human erythropoietin/Fc fusion protein by genetically manipulated chickens / C. A. Penno, K. Yoshinori, I. Akira, K. Masamichi // Transgenic Research. — 2010. — № 19(2). — P. 187-195. doi: 10.1007/s11248-009-9310-z.
19. Lillico S. G. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens / S. G. Lillico, A. Sherman et al // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2007. — № 104. — P. 1771–1776. doi: 10.1073/pnas.0610401104.
20. Nakamura Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells / Y. Nakamura // J. Reprod. Dev. — 2016. — № 62(5). — P. 431–437. doi: 10.1262/jrd.2016-052.

Polteva E., Dementieva N., Scherbakov Yu., Kozikova L., Dysin A., Reinbach N.

Identification of interbreed chicken chimeras and prospects of use

Abstract.

Purpose: Chimeric birds are of interest in breeding and genetic engineering. Identification of such birds was initially phenotypic, for which breeds with contrasting plumage color were used. However, this method is imperfect, and the purpose of this work was to develop an optimal method for identifying interbreed chimeras of birds.

Materials and methods. Based on the Central Clinical Hospital of the Breeding Community "Genetic Collection of Rare and Endangered Chicken Breeds of the All-Russian Research Institute of Chicken Breeding and Geography of the Russian Academy of Sciences", 4 breeds were selected: Poltava Clay, Sussex, Pale Brahma, and Light Brahma as donors and recipients. These breeds were selected based on genetic differences: Pale Brahma and Poltava Clay have the *s+* allele of the Silver gene, Light Brahma and Sussex have the *S* allele of the same gene. The difference between the two alleles is ensured by a single nucleotide substitution C\T, which significantly simplifies identification. Chimeras were obtained by transplanting donor cells into recipient embryos. Among the obtained birds, some demonstrated a mosaic phenotype with the manifestation of the donor breed traits, while others had the phenotype of the recipient breed. After slaughtering the birds, tissue samples were taken from the ovaries, testes and liver. DNA was isolated from them using the standard phenol-detergent method. DNA samples were examined by amplification using allele-specific probes at the *SLC45A2* (Silver) gene locus located on the Z chromosome (alleles *S* and *s+*).

The genotyping **results** showed that among the analyzed DNA samples from 12 experimental birds, 5 were found to have both donor and recipient genotypes. At the same time, in 4 chimeras, the donor genotype was detected in the reproductive organs, i.e. these chimeras are sexual and could pass on the donor genotype to their offspring.

Key words: chimeras, blastodermal cells, chicken breeds, amplification, allele-specific probes.

Authors:

Polteva E. — Junior Researcher; e-mail: ketlin.liselse@yandex.ru;

Dementieva N. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: dementevan@mail.ru;

Scherbakov Yu. — PhD (Biol. Sci.); e-mail: yura.10.08.94.94@mail.ru;

Kozikova L. — Dr Habil. (Bio Sci); e-mail: larkozik@list.ru;

Dysin A. — Junior Researcher;

Reinbach N. — Junior Researcher.

Russian Research Institute of Farm Animal Genetics and Breeding — Branch of the L.K. Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry; 196625, Russia, St. Petersburg, pos. Tyarlevo, Moscow highway, 55a.

References

1. Marzullo G. Production of chick chimeras / G. Marzullo // *Nature*. — 1970. — № 225. — P. 72–73.
2. Petitte J. N. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells / J. N. Petitte, M. E. Clark et al. // *Development*. — 1990. — № 108. — P. 185–189. doi: 10.1242/dev.108.1.185.
3. Thoraval P. Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells / P. Thoraval, F. Lasserre, F. Coudert, G. Dambrine // *Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells*. — 1994. — № 73(12). — P. 1897–1905. doi: 10.3382/ps.0731897.
4. Naito M. Localization of primordial germ cells or their precursors in stage X blastoderm of chicken and their ability to differentiate into functional gametes in opposite-sex recipient gonads / M. Naito, A. Sano et al // *Reproduction*. — 2001. — № 121. — P. 547–552. doi: 10.1530/rep.0.1210547.
5. Etches R. J. Contributions to somatic and germline lineages of chicken blastodermal cells maintained in culture / R. J. Etches, M. E. Clark, A. Toner, G. Liu, A. M. Gibbins // *Molecular Reproduction and Development*. — 1996. — № 45(3). — P. 291–298.
6. Kino K. Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells / K. Kino, B. Pain et al. // *Poultry Science*. — 1997. — № 76(5). — P. 753–760. doi: 0.1093/ps/76.5.753.

7. Etches R. J. Manipulation of blastodermal cells / R. J. Etches, M. E. Clark, L. Zajchowski, G. Spekni-jder, A. M. Verringer Gibbins, K. Kino, B. Pain, J. Samaurt // Poultry Science. — 1997. — № 76. — P. 1075–1083. doi: 10.1093/ps/76.8.1075.
8. Kagami H. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline / H. Kagami, M. E. Clark, A. M. Verrinder Gibbins, R. J. Etches // Molecular Reproduction and Develop-ment. — 1995. — № 42(4). — P. 379–387. doi: 10.1002/mrd.1080420403.
9. Naito M. Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood / M. Naito, Y. Matsubara et al // Journal of Reproduction and Fertility. — 1999. — № 117. — P. 291–298. doi: 10.1530/jrf.0.1170291.
10. Tajima A. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*) / A. Tajima, M. Naito, Y. Yasuda, T. Kuawana // Theriogenology. — 1993. — № 40. — P. 509–519. doi: 10.1016/0093-691x(93)90404-s.
11. Speksnijder G. A modified method of shell windowing for producing somatic or germline chimeras in fertilised chicken eggs / G. Speksnijder, R. Ivarie // Poult. Sci.. — 2000. — № 79. — P. 1430–1433. doi: 10.1093/ps/79.10.1430.
12. Gao J. Contribution of blastoderm cells to Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*)-Peking duck (*Anas platyrhynchos*) chimeras / J. Gao, F. Yuan, X. Tang, H. Han, J. Sha, J. Yuan, Y. Shao, X. Jin, H. Liu, L. Rui, Z. Li // Anim. Sci. J. — 2011. — № 82. — P. 729–734. doi: 10.1111/j.1740-0929.2011.00905.x.
13. Kozikova L. V. Creation of phenotypic chicken chimeras using blastodermal cells of the Light Brahma and Pale Brahma breeds / L. V. Kozikova, E. A. Polteva // Poultry farming. — 2021. — № 6. — P. 7–11. doi: 10/33845/0033-3239-2021-70-6-7-11.
14. Kozikova L. V. Bird chimeras obtained by transplantation of blastodermal cells of the Light Sussex and Poltava Clay breeds / L. V. Kozikova, E. A. Polteva // Poultry and poultry products. — 2021. — № 3. — P. 21–23. doi: 10/30975/2073-4999-2021-23-3-21-23.
15. Bednarczyk M. Reconstitution of a chicken breed by inter se mating of germline chimeric birds / M. Bednarczyk, P. Lakota et al. // Poultry Sci. — 2002. — № 81(9). — P. 1347-1353. doi: 10.1093/ps/81.9.1347.
16. Han J. Y. PGC and genomic editing from laboratory to practice / J. Y. Han; — Paris: Worlds Poultry Congress, 2022. — 69 p.
17. Zinovieva N. A. Transgenic farm animals: current state of research and prospects / N. A. Zinovieva, N. A. Volkova, V. A. Bagirov, G. Brem // Ecological Genetics. — 2016. — № 6. — P. 657-668. doi: 10.1134/S2079059716060101.
18. Penno C. A. Production of recombinant human erythroprotein/Fc fusion protein by genetically manip-ulated chickens / C. A. Penno, K. Yoshinori, I. Akira, K. Masamichi // Transgenic Research. — 2010. — № 19(2). — P. 187-195. doi: 10.1007/s11248-009-9310-z.
19. Lillico S. G. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens / S. G. Lillico, A. Sherman et al // Proc Natl Acad Sci U S A. — 2007. — № 104. — P. 1771–1776. doi: 10.1073/pnas.0610401104.
20. Nakamura Y. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells / Y. Nakamura // J. Reprod. Dev. — 2016. — № 62(5). — P. 431–437. doi: 10.1262/jrd.2016-052.